Aus der Medizinischen Klinik C der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. H. L. Krüskemper)

Zur Methodik der Simultanbestimmung von dialysablem freiem Thyroxin und Trijodthyronin im Serum

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hermann-Josef Kröll

Düsseldorf 1980

Aus der Medizinischen Klinik C der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. H. L. Krüskemper)

Zur Methodik der Simultanbestimmung von dialysablem freiem Thyroxin und Trijodthyronin im Serum

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hermann-Josef Kröll

Düsseldorf 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
gez.: Prof. Dr. H.L. Krüskemper

Referent
gez. Prof. Dr. J. Herrmann
Korreferent
gez.: Prof. Dr. H.Kröner

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Methodik
2.1. Material
2.1.1. Reagenzien
2.1.2. Geräte
2.2. Methodisches Vorgehen
2.2.1. Vorbereitung (Vordialyse)
2.2.2. Analyse
2.2.3. Berechnung der Ergebnisse
2.3. Qualitätskontrolle der Methode
2.3.1. Präzision von Tag zu Tag
2.3.2. Präzision in Serie
2.3.3. Richtigkeit
a) Einfluss der zugesetzten Menge an radioaktivem Tracer-Hormon.
b) Einfluss der Serumverdünnung und der Vorreinigung der Tracer.
c) Einfluss von NaN_3 als Bakteriostatikum.
d) Einfluss einer modifizierten Fällung auf die Resultate.
pH-Wert der Dialysate.
Quantitative Untersuchungen zu den Zwischenschritten der Fällung.
e) Einfluss eines Zusatzes von radioaktivem Jodid im Serum auf die Resultate der Magnesiumchlorid-Fällung.
f) Einfluss der Doppelmarkierung auf die Resultate.
g) Vergleich zwischen Magnesiumchlorid-Fällung und Trichloressigsäure-Fällung.
2.3.4. Spezifität
2.4. Normalwerte
2.5. Methodenkritik (Diskussion zur Methodik)
3. Klinische Ergebnisse
4. Legenden zu den Abbildungen
5. Literaturverzeichnis
6. Lebenslauf

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543910_0068

1. Einleitung

Aus der Beobachtung, dass bei Patienten mit nephrotischem Syndrom das proteingebundene Jod im Serum erniedrigt ist, es mit dem Urin verlorengeht, und klinisch keine Anzeichen einer Schilddrüsenstörung oder eines hypothyreoten Stoffwechselstatus gefunden wurden, stellten Recant und Riggs (47) 1952 die Hypothese auf, dass das proteingebundene Thyroxin im Serum in einem Gleichgewicht mit nichtgebundenem freien Hormon stehen könnte. Wenn sich diese Beziehung durch die Regeln des Massenwirkungsgesetzes beschreiben liesse, würde unter der Annahme, dass nur das nichtgebundene Hormon die Zellwand durchdringen kann und somit stoffwechselaktiv ist, die scheinbare Diskrepanz zwischen erniedrigtem proteingebundenen Jod im Serum (PBI) und euthyreotem Stoffwechselstatus aufgelöst (47). Nach dem Massenwirkungsgesetz folgt einer Erniedrigung des hormonbindenden Eiweissträgers eine Erhöhung des nichtgebundenen Hormonanteils.

Wie unten aufgeführt wird, wurde in den darauffolgenden Jahren eine Reihe von weiteren Fällen beobachtet, bei denen sowohl unter physiologischen und pathologischen Bedingungen als auch unter Medikamenteneinfluss das PBI verändert war, ohne dass eine Änderung des Stoffwechselstatus eintrat.

Durch Dialyse- und Elektrophoresestudien sind drei schilddrüsenhormontragende Plasmaeiweisse bekannt:

1) thyroxinbindendes Globulin (TBG)
   (29, 49)
2) thyroxinbindendes Präalbumin (TBPA)
   (5, 27, 31, 56, 61)
3) Albumin
   (56, 62)

Die ungefähre Verteilung des zirkulierenden Hormons auf die Trägereiweisse ist von Ingbar und Freinkel (29) beschrieben worden: Thyroxin ist zu 45 % an TBG, zu 40 % an TBPA und zu 15 % an Albumin gebunden. Trijodthyronin ist ebenfalls an TBG, TBPA und Albumin gebunden (38). Dem TBG kommt die wichtigste Rolle als Bindungsprotein zu; während auf annähernd 10000 Moleküle Albumin nur 1 Molekül Thyroxin fällt (31, 58).

Die Bindung der Schilddrüsenhormone an die Trägereiweisse wird durch elektrostatische Kräfte vermittelt, wobei die freien kationischen Gruppen der Proteine und die anionische Phenolatgruppe der Hormone beteiligt sind. Gemäss dem geringeren Ionisationsgrad der phenolischen Gruppe des Trijodthyronins, ist die Bindung des Trijodthyronins bei einem pH von 7,4 1/10 der von D- und L-Thyroxin. Die Bindung ist pH-abhängig (55, 65).

Änderungen der Hormonbindungsfähigkeit sind sowohl unter physiologischen und pathologischen Bedingungen als auch unter Medikamenteneinfluss beschrieben worden:

Erhöhte Körpertemperatur führt zu einem 20 - 30 %igen Anstieg des prozentualen freien Thyroxins (4, 52, 55). Bei chronischen Nicht-Schilddrüsenkranken werden erniedrigte TBPA-Bindungsfähigkeit und erhöhtes prozentuales freies Thyroxin gemessen (4, 44). Nach chirurgischen Operationen steigt das prozentuale freie Thyroxin um ungefähr 63 % an. Das TBPA fällt um den gleichen prozentualen Anteil ab. Das Maximum der Veränderungen liegt zwischen dem zweiten und fünften postoperativen Tag (19, 61).

In vitro verdrängen Salicylate, Gentisinsäure, Resorcin, Dinitrophenol und Penicillin Thyroxin vom TBPA (60, 65, 67). Diphenylhydantoin und Salicylate verdrängen in vitro

Thyroxin vom TBG, die freie Thyroxinkonzentration im Serum von Patienten wird durch die üblichen therapeutischen Dosen der Präparate jedoch nicht beeinflusst (7, 43). Heparin-Applikation an Patienten erhöht die Konzentration des freien Thyroxins im Serum. Heparin in vitro ist ohne Effekt auf die Thyroxin-Bindung an Serum-Proteine (51).

Androgene und anabole Steroide in hohen Dosen senken die Bindungsfähigkeit des TBG (16, 46, 50). Prednison erhöht die TBPA-Bindungsfähigkeit und senkt gleichzeitig die Hormonbindung an TBG, das prozentuale freie Thyroxin verändert sich unter Prednisongabe nicht (46). Oestrogene (Ovulationshemmer mit hohem Oestrogenanteil, Schwangerschaft) erhöhen die Konzentration des Serum-TBG. Die Änderung ist schon vom ersten und zweiten Schwangerschaftsmonat an messbar und dauert bis sechs Wochen nach dem Partus an. Das prozentuale freie Thyroxin ist erniedrigt (10, 11, 14, 48).

Beim nephrotischen Syndrom wird trotz hoher renaler Hormonverluste durch eine Vermehrung des prozentualen freien Hormons ein normaler Stoffwechselstatus aufrechterhalten (24, 47). Bei der akuten intermittierenden Porphyrie ist die Konzentration des TBG erhöht, das prozentuale freie Thyroxin erniedrigt, die Stoffwechsellage ist normal (28). Bei kompensierter Lebercirrhose und Virushepatitis ist die TBG-Konzentration erhöht, das prozentuale freie Thyroxin erniedrigt; bei dekompensierter Lebercirrhose ist das TBG niedrig und das prozentuale freie Thyroxin demzufolge hoch (66).
Familiäre, zum Teil vererbte Veränderungen des TBG-Gehaltes (Vermehrung, Erniedrigung) sind beschrieben worden ohne Änderung des Stoffwechselstatus (3, 18, 23, 30, 32, 42, 63).

Da in den oben aufgeführten Situationen das PB^{127}I bzw. das Gesamt-Thyroxin im Serum infolge der veränderten Proteinbindung mehr oder weniger stark erhöht oder erniedrigt ist, die Konzentration an freiem Thyroxin aber im Normbereich liegt und die Patienten auch klinisch gewöhnlich als euthyreot eingestuft sind, konnte gefolgert werden, dass die Funktion der Schilddrüse im Regelkreis durch die Konzentration des freien, nicht aber durch das gebundene Hormon gesteuert wird; das freie Thyroxin somit die eigentliche stoffwechselaktive Hormonfraktion und einen zuverlässigen Parameter zur Beurteilung der Stoffwechselsituation darstellt.

Die Kenntnis der peripheren Dejodination von Thyroxin zu Trijodthyronin (17) und die Frage nach der biologischen Wertigkeit der beiden Schilddrüsenhormone insbesondere in der Substitutionstherapie der Hypothyreose (6, 8) und die Erarbeitung neuer radioimmunologischer Methoden zur Bestimmung der Gesamt-Hormone (25, 26) liessen es interessant erscheinen, die Rolle des freien Trijodthyronins neben der des freien Thyroxins in der Regulation des Stoffwechsels ebenfalls zu überprüfen.

2. Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurden das prozentuale freie Trijodthyronin und freie Thyroxin unter Verwendung verschiedener Markierungen simultan bestimmt mittels Gleichgewichtsdialysetechnik und nachfolgender $MgCl_2$-Fällung der dialysierten freien Fraktionen (20, 22, 59). Die von Herrmann et al. (20, 22) beschriebene Modifikation wurde überprüft und vor allem hinsichtlich der Serumverdünnung und des Fällungsmodus abgeändert.

2.1. Material

2.1.1. Reagenzien

Radioaktives Thyroxin: ^{125}J-L-Thyroxin; spezifische Aktivität um 180 mCi/mg, angeforderte Reinheit grösser als 95 % in 50 % Propylenglykol (Byck Mallinckrodt, Frankfurt).
Radioaktives Trijodthyronin: ^{131}J-L-Trijodthyronin; Trijodthyroninkonzentration um 7 ug/ml, Gesamtaktivität der Chargen um 500 uCi, Reinheit grösser als 95 % in 50 % Propylenglykol (Radiochemical Center, Amersham, England).
Die Chargen werden bei + 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.
Radioaktives ^{131}Jodid: Fa. Hoechst, Frankfurt.
Stabiles Thyroxin: Natrium-Pentahydrat-L-Thyroxin reinst (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg).
Andere Reagenzien: Di-Kalium-hydrogenphosphat, Kalium-dihydrogenphosphat, Di-Natrium-hydrogenphosphat, Tris, Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, 1 N Natronlauge und 32 %ige Salzsäure wurden in p.a. Qualität von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Rinderserumalbumin rein (Reinheit grösser als 95 %) von der Fa. Serva, Heidelberg. Natriumazid von der Fa. Merck, Darmstadt.

Lösungen:

1) Tris-NaCl-Lösung: 0,05 M Tris zu 0.1 M NaCl (12,11 g Tris + 11,68 g NaCl ad 2l).
2) Isotonischer (310 mOsmol/l) Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,4 (39,40 g K_2HPO_4 + 9,84 KH_2PO_4 + 130 mg NaN_3); der pH-Wert stellt sich spontan ein.
3) Magnesiumchlorid-Stammlösung ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$); 40 % (w/v), (200 g $MgCl_2$ ad 500 ml).
4a) Magnesiumchlorid-Präzipitationslösung: 10 %ige $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ in Tris-NaCl, pH: 9,3;

Verdünnung der 40 %igen Magnesiumchlorid-Stammlösung in der Tris-NaCl-Lösung führte zu pH 9,3 ohne Titration.

4b) Die Magnesiumchlorid-Waschlösung hat die gleiche Zusammensetzung wie Lösung 4a); sie wird aber mit Salzsäure auf pH 8,7 bis 8,8 eingestellt.

5) 0,033n NaOH

6) 0,1M Barbitalpuffer, pH 8,6; enthält 0,1 g/100 ml Rinderserumalbumin (BSA).

Alle Lösungen werden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und bei + 4°C gekühlt aufbewahrt.

7) Nicht radioaktive T_4-Lösung (1 mg/ml 0,033n NaOH) wird für jeden Versuch frisch angesetzt, die Menge richtet sich nach der Anzahl der Proben.

8) Sörensen-Phosphat-Puffer für Reinigungsdialyse: 0,15M, pH 7,4 (30 g KH_2PO_4 + 161,01 g Na_2HPO_4 + 490 mg NaN_3 ad 7,5 l).

2.1.2. Geräte

Visking Dialysierschläuche Typ 27/32 (Fa. Serva, Heidelberg), Dialysierschläuche Size 8 x 100 FT (Fa. Union Carbide Corp., Chicago, Ill.). Plastik-Dialysiergefässe: Szintillationsgefässe für ß-Strahlen-Messung 27,0/60 MM (Fa. Grüner, Solingen). Reagenz- und Zentrifugenröhrchen, 16 x 95 mm und 12 x 65 mm (Fa. Sarstedt, Nümbrecht).
Sowohl die Szintillationsgefässe als auch die Reagenzröhrchen werden nur einmal benutzt.

Geeichte 3 ml Vollpipetten; thermokonstanter Wasserbadschüttler, Typ th 15, Kapazität 60 Proben (Fa. Bühler, Tübingen); 2 halbautomatische Pipetten: Autopetten mit

10 ml bzw. 5 ml Inhalt (Fa. Gemetron, Hannover) zum Pipettieren des Dialysierpuffers bzw. der stabilen Thyroxinlösung; Eppendorf-Mikroliter-Pipetten: 0,2 ml, 0,5 ml und 1,0 ml; automatischer Mixer: Super-Mixer (Lab Line Instruments, Melrose Park, Ill., USA, Fa. Jürgens, Hannover); 1 Stock Zentrifuge mit 4 Bechern á 9 Röhrchen (Fa. Stock, Marburg); Wasserstrahlpumpe; 2 Rührgeräte, Laborrührer Typ RZR (Fa. Heidolph L.G., Kehlheim); Zählgerät, Gammazähler BF 5300 (Fa. Berthold, Wildbad).

2.2. Methodisches Vorgehen

2.2.1. Vorbereitung (Vordialyse)

Kommerzielle Tracerchargen sind mit anderen radioaktiven Thyroninen und Jodid in wechselndem Ausmass verunreinigt (53, 64). Diese Verunreinigungen sind an die Serumeiweisse schwächer gebunden als die Schilddrüsenhormone; im Dialysat stellen sie daher einen grossen Anteil der Gesamtradioaktivität dar. Da ausser Jodid diese Verunreinigungen mit $MgCl_2$ fällbar sind (21), werden fälschlicherweise zu hohe Werte für die dialysablen Hormonfraktionen gemessen. Durch die von Schussler und Plager (53) beschriebene Reinigungsdialyse des Tracers werden die Verunreinigungen eliminiert. Dazu werden breite Visking-Dialysierschläuche vom Typ 27/32 auf eine Länge von ungefähr 15 cm geschnitten und in aqua dest. gewässert. Die Schläuche werden an einem Ende verknotet und mit einem Gewicht beschwert. Frisches Sammelserum (4 Teile) und der zu reinigende Tracer (1 Teil) werden gegen 7,5 l Sörensen-Phosphatpuffer über 24 Stunden bei + 4°C und

Dunkelheit dialysiert, wobei der Dialysierpuffer ständig durchmischt wird.
Danach wird das gereinigte Serum-Tracer-Gemisch mittels einer Injektionsspritze abgezogen und in kleinen Portionen (1 ml) bei - 25°C eingefroren.

2.2.2. Analyse

Vorinkubation: vor der Dialyse wird das zu analysierende Serum mit den Tracer-Hormonen inkubiert. Dazu werden 1 ml mit Tracer versetzter Puffer (40 000 cpm ^{131}J-T_3 und ca. 240 ooo cpm ^{125}J-T_4/ml) zusammen mit 0,2 ml des zu analysierenden Serums (1 : 6 Verdünnung) in kleinen Plastikröhrchen (12 x 65 mm) bei + 37°C 30 min lang im Wasserbad inkubiert.
0.5 ml des Tracer-Puffer-Gemisches dienen zur Ermittlung des Vollwertes (= 100 %).
Zwischenzeitlich werden mit Hilfe einer automatischen Pipette 9,0 ml Puffer (ohne Tracer) in die Plastik-Dialysiergefässe gegeben.
Nach der Vorinkubation wird 1 ml des Serum-Tracer-Puffer-Gemisches in jeden Dialysierschlauch einpipettiert. Der Schlauch wird mit einem Doppelknoten verschlossen, an einem Ende gespannt und waagerecht gehalten. In der Mitte des Schlauches befindet sich eine Luftblase (Prinzip Wasserwaage), dort wird der Schlauch geknickt und U-förmig in das mit Puffer beschickte Dialysiergefäss eingebracht. Unter gleichmässigem Schütteln dialysieren die Proben 14 - 16 Stunden in einem Wasserbad bei + 37°C.

Nach dieser Zeit werden zur Fällung nacheinander 3,0 ml Dialysat, 2,0 ml "kalte" T_4-Lösung, 0,2 ml 1n NaOH und 1,0 ml $MgCl_2$-Präcipitationslösung in 16 x 95 mm messende Plastikröhrchen gefüllt, gemischt und etwa 1 min

bei 3000 U/min zentrifugiert. Anschliessend wird im gleichen Röhrchen der klare Überstand nochmals mit 2,0 ml "kalter" T_4-Lösung, 0,2 ml 1n NaOH und 1,0 ml $MgCl_2$-Präcipitationslösung versetzt. Nach erneutem Mischen wird die Probe 10 min bei 3000 U/min scharf zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Rückstände werden ebenso wie der 0,5 ml Vollwert im Gamma-Zähler gemessen.

2.2.3. Berechnung der Ergebnisse

$$FT_4\ (\%)\ /\ FT_3\ (\%)\ :\ \frac{\text{cpm 3 ml Probe-Leerwert x 100}}{\text{cpm 0,5 ml Vollwert-Leerwert x 30}}$$

0,5 ml Puffer-Tracer-Gemisch liefern die cpm des Vollwertes. Der Vollwert ist wie das verdünnte und markierte Serum zusammengesetzt, d.h. bei der 1 : 6 Verdünnung ist zu dem 0,5 ml Puffer-Tracer-Gemisch 0,1 ml Serumanteil zu addieren. Da die Radioaktivität der Probe aus 3 ml gefälltem Dialysat stammt, wird sie mit der Radioaktivität in 3 ml Puffer-Tracer-Serum-Gemisch verglichen. Die cpm des Vollwertes müssen daher mit 5 multipliziert werden. Dies, und die Korrektur des Quotienten mit dem Verdünnungsfaktor 6, liefert den Faktor 30.

Die Konzentrationen der freien Hormone AFT_4 und AFT_3 ergeben sich aus der Multiplikation des prozentualen freien Hormons mit der Gesamthormonkonzentration.

$$AFT_4\ (ng/100\ ml)\ :\ \frac{FT_4\ (\%)\ x\ Ges.\text{-}T_4\ (ug/100\ ml)\ x\ 1000}{100}$$

$$AFT_3\ (pg/100\ ml)\ :\ \frac{FT_3\ (\%)\ x\ Ges.\text{-}T_3\ (ng/100\ ml)\ x\ 1000}{100}$$

2.3. Qualitätskontrolle der Methode

Da die üblicherweise (20, 21, 22) verwendeten breiten Dialysierschläuche (Visking Typ 27/32) während der langen Dialyse grösseren Beschädigungen ausgesetzt sind und bei eventuellen Undichtigkeiten die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verfälschen könnten, wurden Vergleichsuntersuchungen mit schmäleren Dialysierschläuchen der Fa. Union Carbide Corp. (Size 8 x 100 Ft) vorgenommen.

	FT_3 (%)	FT_4 (%)
Pool-Serum	$\bar{x}$ = 0,286	$\bar{x}$ = 0,031
in schmalen	s = 0,010	s = 0,001
Dialysierschläuchen	n = 9	n = 9
Pool-Serum	$\bar{x}$ = 0,282	$\bar{x}$ = 0,031
in breiten	s = 0,016	s = 0,001
Dialysierschläuchen	n = 4	n = 3

Tabelle 1: Vergleichsuntersuchungen mit schmalen und breiten Dialysierschläuchen; Mittelwerte ($\bar{x}$) ± Standardabweichungen (s), Anzahl der Versuche (n)

Wie Tab. 1 zeigt, ergaben die Vergleichsbestimmungen keine signifikanten Unterschiede, so dass die etwas dickeren und dadurch weniger lädierbaren schmaleren Dialysierschläuche verwendet werden konnten.

2.3.1. Präzision von Tag zu Tag

Aus den über einen Zeitraum von 6 Monaten (n = 36) gemessenen Kontrollwerten eines Mischserums (= Pool) wurde die Präzision von Tag zu Tag der Methode berechnet. Mittelwert und Streuung betrugen für das prozentuale freie T_4: 0,024 ± 0,003 %, für das prozentuale freie T_3:

0,198 ± 0,015 %. Die entsprechenden Variationskoeffizienten betrugen demnach 12,5 % bzw. 7,6 %.
Zur Qualitätskontrolle wurden die Pool-Werte aller Versuche in eine Kontrollkarte eingetragen. Versuche, deren Pool-Kontrollwerte ausserhalb des in dieser Vorperiode ermittelten 2s-Bereiches lagen, mussten wiederholt werden. Mit zunehmender Übung im Umgang mit der Methode wurden die Schwankungen der Kontrollwerte geringer (Abb. 1).

2.3.2. Präzision in Serie

Zur Berechnung der Präzision in Serie wurde an einem Tag ein Pool-Serum 15mal bestimmt: Mittelwert und Streuung betrugen für das prozentuale freie T_4: 0,018 ± 0,0006 % und für das prozentuale freie T_3: 0,188 ± 0,0037 %; dies entspricht Variationskoeffizienten von 3,3 % für das prozentuale freie T_4 und 2 % für das prozentuale freie T_3.

2.3.3. Richtigkeit

a) Einfluss der zugesetzten Menge an radioaktivem Tracer-Hormon.

Für die Richtigkeit des Prinzips der Methode wird vorausgesetzt, dass radioaktives Tracer-Hormon denselben Gesetzmässigkeiten gehorcht wie endogenes Serum-Hormon. Da die Menge des eingesetzten radioaktiven Hormons das Bindungsgleichgewicht zwischen endogenem Hormon und seinem Trägerprotein stören könnte und mit fortgeschrittenem Zerfall der Tracer-Charge grössere Mengen an markiertem Hormon in den Versuch eingesetzt werden müssen, wurden bei allen Versuchen die eingesetzten Hormonmengen im Tracer (berechnet als ug radioaktives

Hormon pro 100 ml Serum) mit den gemessenen Pool-Werten korreliert. Die Tracer-T_3-Zugabe reichte von 0,166 - 3,07 ug T_3/100 ml Serum - im Durchschnitt lag sie bei 2,20 ug T_3/100 ml Serum; die Tracer-T_4-Zugabe reichte von 0,2 - 3,76 ug T_4/100 ml Serum. Die Korrelationskoeffizienten waren für das freie T_3 r = 0,108 und für das freie T_4 r = 0,302. Im Bereich der eingesetzten Tracermengen ergaben sich also keine signifikanten positiven Abhängigkeiten zwischen eingesetzter Menge an radioaktivem Hormon und gemessenem prozentualen freien Hormon.

b) Einfluss der Serumverdünnung und der Vorreinigung der Tracer.

Nach Zugabe frisch vorgereinigter Tracer zu einem Misch-Serum wurde eine Verdünnungsreihe mit Dialyse-Puffer hergestellt, die Nativserum;1:2; 1:3; 1:6; 1:12; 1:24; 1:48; 1:96-Verdünnungen umfasste. Eine gleiche Serum-Verdünnungsreihe wurde erstellt, in der die Tracer nicht gereinigt waren (Original-Tracer). Nach üblicher Vorinkubation wurden aus 1 ml Aliquots der Verdünnungen die freien Hormonfraktionen bestimmt. Zur Berechnung des prozentualen freien T_3 und T_4 wurde die jeweilige Verdünnung berücksichtigt:

$$FT_3(\%) \;/\; FT_4(\%): \frac{\text{cpm im Präzipitat aus 3 ml Dialysat-Leerwert x 100}}{\text{cpm Vollwert (3 ml) x Verdünnung}}$$

Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt. Nach Beendigung der Dialyse wurden für jede Verdünnung getrennt die Inhalte der jeweiligen Dialysierschläuchchen vereinigt und quantitativ aufgefangen. Statt der erwarteten 4,0 bzw. 3,0 ml wurden bei Nativserum und 1:2

Tabelle 2: Mittelwerte und Streuungen des prozentualen freien T_3/T_4 in Abhängigkeit von der Verdünnung des eingesetzten Serums.

Serum-verdünnung	gereinigter Tracer			nicht gereinigter Tracer		
	Volumina der Säckcheninhalte (ml)	FT_3 (%)	FT_4 (%)	Volumina der Säckcheninhalte (ml)	FT_3 (%)	FT_4 (%)
Nativserum (n=4)	5,0	$0,223^{x^1}$ ±0,004	$0,028^{x^1}$ ±0,003	4,6	$0,387^{x^3}$ ±0,014	$0,133^{x^3}$ ±0,006
1:2 (n=4)	4,5	$0,217^{x^2}$ ±0,012	$0,026^{x^2}$ ±0,001	4,4	$0,320^{x^4}$ ±0,004	$0,087^{x^4}$ ±0,003
1:3 (n=4)	4,3	0,220 ±0,004	0,026 ±0,001	4,2	0,301 ±0,012	0,072 ±0,002
1:6 (n=3)	3,1	0,203 ±0,005	0,023 ±0,005	3,0	0,236 ±0,003	0,043 ±0,001
1:12 (n=3)	3,0	0,169 ±0,004	0,020 ±0,0005	3,0	0,196 ±0,004	0,031 ±0,001
1:24 (n=4)	4,2	0,133 ±0,005	0,020 ±0,0000	4,0	0,133 ±0,009	0,022 ±0,0005
1:48 (n=4)	4,0	0,100 ±0,001	0,020 ±0,0005	4,0	0,088 ±0,007	0,019 ±0,001
1:96 (n=4)	4,0	0,061 ±0,003	0,020 ±0,001	4,0	0,059 ±0,002	0,018 ±0,001

x Korrigierte Werte

Korrekturfaktoren: $x^1 = 1,25$; $x^2 = 1,125$; $x^3 = 1,15$; $x^4 = 1,10$ (s. Text)

Verdünnung Volumina zwischen 4,4 und 5,0 ml gefunden. Bei diesen Verdünnungen wurde also der Säckcheninhalt während der Dialyse infolge Osmose etwas verdünnt. Die nach der allgemeinen Berechnungsformel für die freien Fraktionen erhaltenen Werte mussten durch Division durch die zusätzliche Serumverdünnung korrigiert werden.

Die Beziehung zwischen Tracer-Vorbehandlung, Serum-Verdünnung und gemessenen Werten wurde anhand der Tabelle in einem Diagramm dargestellt (Abb. 2). Es fällt auf, dass die ermittelten Werte für das prozentuale freie T_3 und T_4 unter Verwendung nicht vorgereinigten Original-Tracers mit zunehmender Serumverdünnung annähernd kontinuierlich abfallen. Dagegen bleiben bei Verwendung gereinigten Tracers die ermittelten Werte des freien T_4 über den gesamten Verdünnungsbereich und die des freien T_3 bis zu einer 1:6 Verdünnung fast konstant. Die Werte des prozentualen freien T_3 fallen erst bei stärkerer Serumverdünnung kontinuierlich weiter ab.

Die Gesamtverdünnung der dialysierbaren Serumbestandteile ist in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge des Aussenmediums wesentlich höher als die Serumverdünnung selbst. Bei obiger Verdünnungsreihe (1,0 ml Säckcheninhalt mit Verdünnungen bis 1:96) reicht bei 9,0 ml Dialysierpuffer als Aussenmedium die Gesamtverdünnung der dialysierbaren Serumbestandteile von 1:10 bis zu 1:960. Wie später gezeigt wird (s. Methodenkritik), ergibt die Berechnung des prozentualen freien T_3 und T_4 bei Berücksichtigung der Gesamtverdünnung gleiche Ergebnisse wie nach Korrektur für die Serumverdünnung.

In einem weiteren Versuch wurde der Inhalt der Dialysiersäckchen konstant gehalten und das Volumen an eingesetztem Dialysierpuffer variiert. Es wurden vorgereinigte

Tracer verwendet und je 0,6 ml Serum verdünnt mit 3,0 ml Puffer-Tracer-Gemisch gegen 5,10 und 15 ml Puffer dialysiert. Bei diesem Versuch wurden breite Dialysierschläuche vom Typ Visking 27/32 verwendet. Wie Tab. 3 zeigt, liegen die Werte des prozentualen freien T_3 und T_4 trotz unterschiedlicher Gesamtverdünnung im gleichen Messbereich.

Tabelle 3: Einfluss verschiedener Volumina an Dialysierpuffer auf die prozentualen freien T_3/T_4-Werte.

eingesetzte Puffer-Volumina als Aussenmedium ml	Serum-Verdünnung	Inhalt der Dialysierschläuche	Gesamtverdünnung der dialysablen Serumbestandteile	FT_3 (%)	FT_4 (%)
5	1:6	0,6 ml Serum plus 3,0 ml Puffer	1:14,3	0,269	0,021
10			1:22,6	0,222	0,018
15			1:31,0	0,226	0,020

c) Einfluss von Natrium-Azid (NaN_3) als Bakteriostatikum

Der noch relativ hohe Eiweissgehalt des Säckcheninhalts bei einer 1:6 Verdünnung und die lange Inkubationszeit bei 37°C lassen bakterielle Verunreinigung des Dialysats wahrscheinlich werden. Tatsächlich war das Dialysat bei Proben ohne Zusatz eines Bakteriostatikums trübe. Durch Zusatz von 0,001 M NaN_3 liessen sich klare Dialysate erzielen, die Ergebnisse wurden dadurch nicht verändert (Tab. 4).

Tabelle 4: Prozentuales freies T_3/T_4 unter Zusatz von NaN_3 zum Dialysierpuffer

	ohne Bakteriostatikum	mit 0,001 M NaN_3
FT_3 (%)	$\bar{x}$ = 0,185 s = 0,008 n = 8	$\bar{x}$ = 0,189 s = 0,011 n = 8
FT_4 (%)	$\bar{x}$ = 0,032 s = 0,002 n = 8	$\bar{x}$ = 0,030 s = 0,002 n = 7

d) Einfluss einer modifizierten Fällung auf die Resultate

Ziel der Fällung ist es, das Dialysat von radioaktiven Verunreinigungen zu befreien, insbesondere von radioaktivem Jodid. Die extreme Unlöslichkeit von Magnesiumsalzen des Thyroxins ist von Kendall und Osterberg 1919 beschrieben worden (35). Lardy (37) fasst die Verbindung aus Magnesium und Thyroxin als Chelat-Komplex auf, bestehend aus drei Molekülen Thyroxin und einem Magnesium-Ion. Das Fällungsoptimum liegt in einem pH-Bereich von 8,5 - 9,0. Zugabe von Natronlauge soll einerseits das Dialysat in den Bereich des optimalen pH bringen, auf der anderen Seite sollen durch eine ausreichende Menge an entstehendem Magnesiumhydroxid Präzipitatverluste beim Absaugen des Überstandes gering gehalten werden.

pH-Wert der Dialysate.

In 13 Dialysaten aus Pool-Serum wurde sofort nach der

Dialyse der pH-Wert gemessen. Er betrug bei allen Proben 7,4.
Diese Dialysate wurden vereinigt, in vier Teile geteilt und nach Zusatz unterschiedlicher Mengen an 1 n NaOH gefällt. Der pH-Wert wurde nach dem ersten Fällen gemessen. Die Resultate sind in Abb. 3 dargestellt. Die Mittelwerte des prozentualen freien T_4 liegen bis zu einem pH von 8,7 auf gleichem Niveau; zu pH 11,0 hin erfolgt ein Abfall. Beim prozentualen freien T_3 reicht das Plateau bis zu einem pH von 8,1 bzw. einer Zugabe von 0,2 ml einer 1 n NaOH-Lösung, von da aus zu höheren pH-Werten hin fallen die Werte ab.
Ohne NaOH-Zusatz ergeben sich geringe Präzipitatmengen, die eben den Boden des Reagenzglases bedecken. Bei Zugabe von 0,2 ml 1 n NaOH fällt dichter weisser Niederschlag aus, der nach Zentrifugieren etwa einen Bodensatz von 1,5 cm Höhe ergibt. Grössere NaOH-Zusätze verringern die Präzipitatmenge wieder. Ein Zusatz von 0,2 ml 1 n NaOH wurde daher als optimal abgesehen.

Quantitative Untersuchungen zu den Zwischenschritten der Fällung.

Das von Herrmann et al. (20, 21, 22) modifizierte Verfahren der von Sterling und Brenner (59) eingeführten Gleichgewichtsdialyse mit nachfolgender Magnesiumchlorid-Präzipitation des Dialysats wurde in den Einzelschritten der Fällung quantitativ untersucht. Nach dieser Modifikation wird das nach Magnesiumchlorid-Fällung erzielte Präzipitat abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und der Niederschlag noch zweimal mit je 5 ml einer Magnesiumchlorid-Waschlösung (pH 8,7) gewaschen.

Um zu überprüfen, ob mit einmaliger Magnesiumchlorid-

Behandlung die Thyronine des Dialysats quantitativ gefällt werden, wurde die Radioaktivität (cpm) dreier Dialysate aus einem Versuch, der mit gereinigtem Tracer angesetzt war, sowohl nach der Fällung als auch nach jedem der beiden Aufwaschvorgänge bestimmt. Die Zählrate des Präzipitats nach dem zweiten Waschvorgang wurde in Prozent der Radioaktivität des Dialysats vor der Fällung ausgedrückt. Die mit diesem ursprünglichen Verfahren erzielten Fällungsraten lagen für das freie T_3 wie für das freie T_4 zwischen 82 und 87 % (Tab. 5).

Tabelle 5: Fällungsraten (%), ursprüngliches Verfahren

	cpm 3 ml Dialysat (= 100 %)	cpm Präzipitat nach 2. Waschen	% gefällt	FT_3/FT_4 (%)
		$^{131}J\ T_3$		
1)	1484	1294	87	0,155
2)	1556	1333	86	0,160
3)	1518	1242	82	0,149
		$^{125}J\ T_4$		
1)	694	574	83	0,021
2)	733	601	82	0,022
3)	691	594	86	0,022

Zur Überprüfung der Zwischenschritte wurde der üblicherweise verworfene Überstand nach der Fällung quantitativ abgehebert. Drei ml davon wurden wie das ursprüngliche Dialysat gefällt und gewaschen. Die gemessenen cpm

wurden auf das Gesamtvolumen (je 6,5 ml) des abgeheberten Überstandes umgerechnet (Tab. 6) und zu den cpm des ersten Präzipitates addiert. Diese "Summen-cpm" wurden in Relation gesetzt zu den cpm der Dialysevormessung, ausgedrückt als Prozent der Fällung (Tab. 7).

Tabelle 6: Überprüfung der Zwischenschritte: nochmalige Präzipitation von 3 ml Überstand aus der ersten Fällung

	cpm 3 ml Überstand	cpm Präzipitat nach 2. Waschen	cpm im Gesamt-Präzipitat aus 6,5 ml Überstand
		$^{131}J\ T_3$	
1')	42	28	60
2')	37	27	58
3')	39	26	56
		$^{125}J\ T_4$	
1')	58	32	69
2')	70	39	84
3')	65	36	78

Wegen der niedrigen Zählrate in den Überständen wurden diese Proben über 10 min gezählt. Wenn auch in diesem niedrigen cpm-Bereich die Zählgenauigkeit des Messgerätes gering ist, so lagen die erhaltenen Zählraten doch deutlich über dem Geräte-Leerwert. Dies legte den Schluss nahe, dass mit einmaligem Fällen die freien Hormone nicht quantitativ präzipitiert wurden. Ein Vergleich der

Resultate in Tab. 5 mit denen in Tab. 7 zeigt, dass die Werte für das freie T_3 um etwa 5 %, für das freie T_4 jedoch um 14 % durch die modifizierte Fällung angehoben wurden.

Tabelle 7: Korrigierte Fällungsraten ("Summen-cpm")

	cpm 3 ml Dialysat (= 100%)	cpm Fällung 1 + cpm Fällung 2	% gefällt	FT_3/FT_4 (%)
		$^{131}J\ T_3$		
1'')	1484	1294 + 60	91	0,162
2'')	1556	1333 + 58	89	0,167
3'')	1518	1242 + 56	85	0,156
		$^{125}J\ T_4$		
1'')	694	574 + 69	93	0,024
2'')	733	601 + 84	93	0,025
3'')	691	594 + 78	97	0,025

Um den Fehler durch nicht quantitative Präzipitation zu verringern, wurde diese Modifikation beibehalten; d.h. nach dem ersten Fällen und Zentrifugieren wurde der Überstand nicht verworfen, sondern wie oben beschrieben nochmals gefällt. Tab. 8 zeigt nochmals den Effekt des modifizierten Fällungsverfahrens anhand eines Vergleiches mit dem ursprünglichen Vorgehen. Die Erhöhung des prozentualen freien T_4 um 14 % und des prozentualen freien T_3 um 5 - 7 % durch die modifizierte Fällung konnte durch

diesen Versuch bestätigt werden.
Die mit der Modifikation erzielten Resultate FT_4 (%): 0,032 ± 0,0008; FT_3 (%): 0,207 ± 0,0025 lagen hochsignifikant ($p < 0,001$) über den aus dem gleichen Pool-Serum erzielten Vergleichswerten (FT_4 (%): 0,028 ± 0,005; FT_3 (%): 0,192 ± 0,0043).

Tabelle 8: Vergleich zwischen ursprünglichem und modifiziertem Fällungsverfahren anhand eines Mischserums.

	cpm 3 ml Dialysat		cpm Präzipitat		% gefällt		% freies Hormon	
	$^{131}JT_3$	$^{125}JT_4$	$^{131}JT_3$	$^{125}JT_4$	$^{131}JT_3$	$^{125}JT_4$	FT_3	FT_4
ursprüng-	1106	1605	1057	1266	95	78	0,197	0,028
liches	1080	1665	1017	1271	94	76	0,190	0,028
Verfahren	1092	1669	1011	1244	92	74	0,189	0,028
	1142	1717	1024	1286	89	74	0,191	0,029
modifi-	1149	1775	1108	1421	96	80	0,207	0,032
ziertes	1161	1729	1123	1439	97	83	0,210	0,032
Verfahren	1138	1662	1108	1359	97	82	0,207	0,030
	1132	1757	1121	1426	99	81	0,209	0,032
	1138	1728	1122	1414	98	82	0,209	0,032
	1097	1693	1086	1444	99	85	0,203	0,032

e) Einfluss eines Zusatzes von radioaktivem Jodid zum Serum auf die Resultate der Magnesiumchlorid-Fällung.

Um zu überprüfen, ob radioaktives Jodid im Serum und

somit im Dialysat die Radioaktivität des Magnesiumchlorid-Präzipitates beeinflusst, wurden sechs Proben eines Pool-Serums dialysiert. Zu vier Dialysaten wurde ^{131}Jodid zugegeben, so dass eine Jodidverunreinigung von ungefähr 100 cpm oder etwa 15 % resultierte. Die Dialysate wurden gefällt und zweimal gewaschen, die cpm wurden nach jedem Zwischenschritt gezählt. Wie aus Tab. 9 ersichtlich ist, wurde die zugegebene relativ hohe Jodidverunreinigung nicht mitpräzipitiert; die Ergebnisse somit nicht verfälscht.

f) Einfluss der Doppelmarkierung auf die Resultate.

Um zu überprüfen, ob die Simultanbestimmungen des prozentualen freien T_3 und T_4 sich gegenseitig beeinflussen, wurden in der gleichen Versuchsanordnung die dialysablen Fraktionen in verschiedenen Messbereichen sowohl einzeln als auch kombiniert bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abb. 4 dargestellt.
Die in Einzelmarkierung gemessenen Werte stimmen mit denen aus der Doppelmarkierung sehr gut überein ($r = 0{,}983$ für FT_4 (%); $r = 0{,}992$ für FT_3 (%)). Die Regressionsgeraden $y = 1{,}13\ x - 0{,}002$ (FT_4 (%)) und $y = 0{,}994\ x + 0{,}0067$ (FT_3 (%)) weichen nur unwesentlich von $y = x$ ab.

g) Vergleich zwischen Magnesiumchlorid-Fällung und Trichloressigsäure-Fällung.

Die Magnesiumchlorid-Fällung wurde verglichen mit der von Oppenheimer et al. angegebenen Trichloressigsäure (TCA)-Fällung (44). Entsprechend dieser Methode wurden 3 ml Dialysat mit 3 ml Pool-Serum gemischt und mit 2 ml 20 %iger TCA-Lösung gefällt. Der Niederschlag

Tabelle 9: Einfluss einer Jodidverunreinigung im Dialysat auf die Resultate.

	3 ml Dialysat (cpm)		3 ml Dialysat + ^{131}Jodid (cpm)		Präzipitat nach Fällung (cpm)	
	$^{131}JT_3$	$^{125}JT_4$	$^{131}JT_3$	$^{125}JT_4$	$^{131}JT_3$	$^{125}JT_4$
Dialysat	763	970	---	---	656	786
ohne	805	896	---	---	674	747
Jodidzugabe						
Dialysat	777	932	849	871	683	754
mit	734	880	838	840	675	662
^{131}Jodid	768	897	833	861	665	688
versetzt	777	897	878	843	666	700

	Präzipitat nach dem 1. Waschen (cpm)		Präzipitat nach dem 2. Waschen (cpm)		FT_3 (%)	FT_4 (%)
	$^{131}JT_3$	$^{125}JT_4$	$^{131}JT_3$	$^{125}JT_4$		
Dialysat	631	702	654	702	0,160	0,019
ohne	638	622	663	653	0,162	0,017
Jodidzugabe						
Dialysat	634	647	650	660	0,159	0,018
mit	599	577	615	603	0,150	0,016
^{131}Jodid	622	633	655	605	0,160	0,016
versetzt	635	621	654	620	0,160	0,017

wurde zwei Minuten mit einem Glasstab aufgerührt und zehn Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert. Die Präzipitate wurden zweimal mit je 3 ml 5 %iger TCA-Lösung gewaschen. Fünfzehn Proben mit Magnesium-

chlorid-Fällung und dreizehn Proben mit TCA-Fällung aus dem gleichen Dialysat-Pool wurden verglichen.

Tabelle 10: Vergleich zwischen Magnesiumchlorid- und TCA-Fällung aus einem Dialysat-Pool; Mittelwerte ($\bar{x}$); ± Standardabweichungen (s); Anzahl der Versuche (n).

$MgCl_2$ - Fällung		TCA - Fällung	
FT_3 (%)	FT_4 (%)	FT_3 (%)	FT_4 (%)
$\bar{x}$ = 0,188	$\bar{x}$ = 0,018	$\bar{x}$ = 0,191	$\bar{x}$ = 0,018
s = ± 0,0037	s = ± 0,0006	s = ± 0,0045	s = ± 0,0008
n = 15	n = 15	n = 13	n = 13

Wie aus Tab. 10 ersichtlich, liefern beide Fällungsverfahren identische Ergebnisse.

2.3.4. Spezifität

Die Spezifität der Methode hängt von der Reinheit des eingesetzten Tracers ab, bzw. von den während des Zerfalls entstehenden radioaktiven Produkten. Kommerzielle Tracerchargen sind mit anderen radioaktiven Thyroninen und Jodid in wechselndem Ausmass verunreinigt (53, 64). Mit Ausnahme von Jodid sind diese Verunreinigungen mit Magnesiumchlorid fällbar (21); diese Verunreinigungen

lassen sich durch die von Schussler und Plager beschriebene Reinigungsdialyse eliminieren (53). Die Abb. 2 zeigt den erhöhenden Einfluss der Verunreinigungen auf die Werte des prozentualen freien T_3 und T_4, der sich besonders bei geringer Serumverdünnung auswirkt. Beim Zerfall der markierten Hormone entsteht Jodid, aber, wie Volpert et al. durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie nach der Verfallzeit des Tracers nachwiesen, keine weiteren radioaktiven Thyronine (64). Wie Tab. 9 zeigt, wird Jodid bei der Magnesiumchlorid-Fällung nicht mitpräzipitiert.

Mit der oben beschriebenen Methode wurden bei 39 schilddrüsengesunden und 35 schilddrüsenkranken Patienten sowie bei 37 Schwangeren die freien Fraktionen von T_3 und T_4 im Serum bestimmt; aus diesen und den Werten für Ges.-T_3 und Ges.-T_4 wurden AFT_3 und AFT_4 berechnet. Mittelwerte, Streuungen und Bereiche sind in Tab. 11 dargestellt. Die Bereiche für Eu-, Hypo- und Hyperthyreose sind gut voneinander abgegrenzt. In der Schwangerschaft liegen die Konzentrationen sowohl des freien T_4 als auch des freien T_3 eindeutig im Euthyreosebereich.

In Tab. 12 sind die Normalbereiche aus neueren Veröffentlichungen zusammengestellt, deren Autoren mit vorwiegend gleicher Methodik (Gleichgewichtsdialyse mit nachfolgender $MgCl_2$-Präzipitation des Dialysates) gearbeitet haben.

Unsere Normalbereiche sind dazu in guter Übereinstimmung.

2.4. Normalwerte

Tabelle 11: Freies T_3/T_4 bei Eu-, Hypo- und Hyperthyreosen sowie in der Graviditär.

	FT_4 (%)	AFT_4 (ng/dl)	FT_3 (%)	AFT_3 (pg/dl)
	Euthyreose (n=39)			
$\bar{x} \pm s$	0,023 ± 0,003	1,86 ± 0,59	0,202 ± 0,026	258 ± 76
Bereich	(0,020 - 0,030)	(0,90 - 3,32)	(0,154 - 0,236)	(146 - 422)
	Hyperthyreose (n=26)			
$\bar{x} \pm s$	0,041 ± 0,008	8,80 ± 4,73	0,312 ± 0,042	1176 ± 556
Bereich	(0,031 - 0,060)	(4,21 -26,6)	(0,262 - 0,429)	(587 - 2390)
	Hypothyreose (n=9)			
$\bar{x} \pm s$	0,015 ± 0,002	0,332 ± 0,205	0,123 ± 0,024	56 ± 33
Bereich	(0,014 - 0,018)	(0,120 - 0,770)	(0,099 - 0,163)	(13 - 102)
	Graviditas (n=26 für freies T_4) (n=11 für freies T_3)			
$\bar{x} \pm s$	0,012 ± 0,002	1,51 ± 0,24	0,130 ± 0,023	220 ± 43
Bereich	(0,010 - 0,018)	(1,11 - 2,20)	(0,107 - 0,161)	(164 - 303)

elle 12: Zusammenstellung von Normalwerten aus der Literatur.

ffwechsel e	FT_4 (%)	AFT_4 (ng/dl)	FT_3 (%)	AFT_3 (pg/dl)
(a) Anderson, 1968; (1)				
n=42	0,019±0,002	1,77±0,25	---	---
er n=20	0,040±0,011	8,47±2,87	---	---
n=22	0,016±0,005	0,54±0,29	---	---
(a) Arango et al., 1968; (2)				
n=316	0,035±0,001	2,49±0,06	---	---
er n=63	0,054±0,003	8,42±0,66	---	---
n=72	0,026±0,001	0,48±0,05	---	---
(a) Herrmann et al., 1971; (22)				
n=118	0,025±0,005 (0,018-0,036)	2,1 ±0,54 (1,3 -3,5)	---	---
er n=56	0,055±0,019 (0,024-0,086)	12,6 ±8,7 (4,1 -28,9)	---	---
n=18	0,018±0,005 (0,014-0,029)	0,39±0,31 (0,1 -1,3)	---	---
(a) Dussault et al., 1973; (12)				
albereich	---	---	(0,22-0,40)	(150-450)
(a) Chopra et al., 1974; (9)				
albereich ;	0,030±0,001 (0,020-0,048)	2,8 ±0,1 (1,8 -4,2)	0,34±0,01 (0,23-0,47)	375±21 (237-619)
(a) Michajlovskij et al., 1974; (40)				
albereich	0,025±0,0015	2,86±0,14	---	---
(b) Engler et al., 1978; (15)				
albereich für AFT_4 für AFT_3	---	(1,2 -3,6)	---	(230-460)

Legenden zu Tabelle 12:

a = Gleichgewichtsdialyse mit $MgCl_2$-Präzipitation des Dialysates; Modifikationen der Originalmethode von Sterling und Brenner, 1966 (59).

b = Trennung des freien und gebundenen Thyroxins durch Sephadex G-25, Irvine, 1974 (34).

n = Anzahl der Versuche

eu = Euthyreose

hyper = Hyperthyreose

hypo = Hypothyreose

2.5. Methodenkritik (Diskussion zur Methodik)

Zur Bestimmung der dialysablen Fraktionen mittels Gleichgewichtsdialyse und nachfolgender $MgCl_2$-Präzipitation müssen zwei wesentliche Bedingungen erfüllt sein: 1. die dialysierbare Substanz muss in einem mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes zu beschreibenden Bindungsgleichgewicht zu einem als Reservoir dienenden Träger (T_3- und T_4-bindende Serumproteine) stehen, und 2. zur Trennung von möglichen radioaktiven Kontaminationen muss diese Substanz mit Magnesium eine weitgehend unlösliche Verbindung eingehen.

In der vorliegenden Arbeit sind verschiedene Aspekte der Gleichgewichtseinstellung zwischen gebundenen und freien Hormonen sowie der Trennung der markierten freien Hormone von radioaktiven Verunreinigungen unter "in vitro"-Bedingungen näher untersucht worden mit dem Ziel, die Bestimmung der freien Schilddrüsen-Hormonfraktion so verlässlich wie möglich zu machen. Der Versuch einer Optimierung einer solchen in vitro Methode sollte darauf hinzielen, einer Reproduzierung physiologischer Verhältnisse in vivo möglichst nahe-

zukommen. Für die Gleichgewichtseinstellung zwischen gebundenem und freiem Schilddrüsenhormon sind mehrere Faktoren bekannt, die sowohl in vivo als auch in vitro von entscheidender Bedeutung sind:
Verschiebungen des pH-Wertes des Serums in den sauren Bereich lässt die Bindung der Hormone an Serumeiweisse zunehmen, im alkalischen Milieu nimmt sie ab (37).
Mit Hilfe eines entsprechenden Phosphat-Puffers konnte der pH-Wert bei der in vitro-Bestimmung konstant bei 7,4 gehalten werden.
Das Bindungsgleichgewicht ist weiterhin temperaturabhängig. Anstieg der Körpertemperatur (Fieber) führt ebenfalls zu einer Zunahme der dialysablen T_4-Fraktion (4, 45). Inkubation der Proben im thermokonstanten Wasserbad ermöglichte Einhalten einer gleichbleibenden Temperatur von 37°C.
Infolge der starken Proteinbindung der Schilddrüsenhormone stellt sich das Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Fraktion nicht sofort, sondern erst nach mehreren Stunden ein. Ein Plateau wird gewöhnlich nach 12 Stunden erreicht (41, 59); aus labortechnischen Gründen haben wir routinemässig über 16 Stunden dialysiert.

Diese lange Dauer der Dialyse führt bei entsprechend hoher Temperatur (37°C) zum Wachstum von Bakterien im Dialysat. Auf die Höhe der dialysablen Fraktionen haben diese bakteriellen Verunreinigungen keinen Einfluss. Trotzdem wurde routinemässig Natriumazid als Bakteriostatikum eingesetzt, das in der gewählten Konzentration ebenfalls keinen Einfluss auf die Ergebnisse zeigte (Tab. 4).
Für die Richtigkeit der Methode von entscheidender

Bedeutung ist der Nachweis, dass die markierten Hormone sich in vitro wie die endogenen, nicht markierten Hormone verhalten; d.h., dass sich das Tracer-Hormon schnell und vollständig mit dem gebundenen endogenen äquilibriert und das Verhältnis zwischen markiertem und nicht markiertem freien Hormon gleich dem zwischen radioaktivem und endogenem proteingebundenen Hormon ist. Dieser Nachweis wurde für das Dialyseverfahren bereits von anderen (39) erbracht.

Aus Abb. 2 ist ersichtlich, wie wichtig in dieser Hinsicht die Verwendung reiner Tracerchargen ist: wenn nicht gereinigte, mit radioaktivem Jodid, aber vor allem mit $MgCl_2$-fällbaren (21), markierten anderen Thyroninen kontaminierte Tracer verwendet wurden, wurde in der hier gewählten 1:6 Verdünnung des Serums das prozentuale freie T_4 um 87 % zu hoch (0,043—— 0,023%), das freie T_3 immerhin noch um 16 % zu hoch gemessen (0,236—— 0,203%). Daraus ergibt sich, dass zum Erreichen reproduzierbarer und richtiger Ergebnisse stets reine, d.h. vordialysierte Tracer-Hormone verwendet werden müssen.

Von weiterer entscheidender Bedeutung für die Reproduzierbarkeit und Richtigkeit ist, dass durch die Menge an zugegebenem Tracer-Hormon das endogene freie Hormon nicht erhöht werden darf. Die eingesetzte Tracermenge muss andererseits so hoch sein, dass bei der kommerziell erhältlichen spezifischen Aktivität der Markierung die Zählrate in den Dialysaten ausreichend gross ist, um messtechnische Fehler so gering wie möglich zu halten. Der Einfluss des TBG-Gehalts des Serums und der eingesetzten Tracermenge auf die Höhe des gemessenen

freien T_4 ist von anderen bereits ausführlich untersucht worden (33, 39). Sterling und Brenner (59) haben in ihrer Originalbeschreibung der Methode nachgewiesen, dass ein Tracerzusatz bis zu 3 ug/100 ml eines normalen Mischserums keinen Einfluss auf die dialysable T_4-Fraktion ergab. Naumann et al. (41) beschrieben, dass eine T_3-Zugabe bis zu 2 ug/100 ml Serum die Werte für das freie T_3 nicht veränderte. Die fehlenden positiven Korrelationen zwischen der Höhe des Pool-Kontrollwertes und der zugesetzten Tracermengen zeigen, dass die gemessenen Werte durch die von uns eingesetzten Tracermengen (0,2 - 3,76 ug T_4 bzw. 0,2 - 3,0 ug T_3/100 ml Serum) nicht verfälscht werden.

Der Einfluss der Serumverdünnung auf die gemessenen Werte der dialysablen Fraktionen ist wesentlich für die Richtigkeit der Methode. Sterling und Hegedus (57) fanden bei Dialyse von Vollserum, bedingt durch den osmotischen Effekt des Serums, eine nicht beabsichtigte Serumverdünnung um den Faktor 0,8. Diese Verdünnung durch Osmose, der Einsatz grosser Serummengen, bakterielle Verunreinigung, grösserer Einfluss von Versuchsfehlern und grössere methodische Fehler (54) lassen den Einsatz von verdünntem Serum wünschenswert erscheinen.

In einer theoretischen Analyse der Bindungsverhältnisse unter Gleichgewichtsbedingungen zeigten Oppenheimer und Surks (45), dass die Konzentration des freien T_4 weitgehend abhängig von der zur Bestimmung eingesetzten Serumverdünnung ist. Abb. 2 zeigt unter Verwendung von gereinigtem und nicht gereinigtem Tracer den Einfluss der Serumverdünnung (Nativserum bis 1:96 Verdünnung) auf die

prozentualen Werte des freien T_3 und T_4. Schwach an die Trägereiweisse gebundene Tracerverunreinigungen, die dialysierbar (53, 64) und mit $MgCl_2$ fällbar sind (21) erhöhen fälschlicherweise bei Verwendung nicht gereinigten Tracers die Werte der dialysablen Fraktionen. In Abb. 2 fallen bei Verwendung von nicht gereinigtem Tracer die ermittelten Werte für das prozentuale freie T_3 und T_4 mit zunehmender Serumverdünnung annähernd kontinuierlich ab. Durch Tracerreinigung mittels Vordialyse (53) bleiben die ermittelten Werte des freien T_4 über den gesamten Verdünnungsbereich und die des freien T_3 bis zu einer 1:6 Verdünnung fast konstant (Abb. 2). Bedingt durch die schwächere Bindung des Trijodthyronins an die Trägereiweisse (56, 65) fallen die Werte des freien T_3 bei stärkerer Serumverdünnung kontinuierlich ab (Abb. 2).

Die Serumverdünnung geht in die Berechnung des freien Hormons ein; dabei liefert die Berechnung über die Serumverdünnung im Dialysanden, wie von uns geübt, oder über die Verdünnung im gesamten Dialysesystem, wie von Oppenheimer und Surks beschrieben (45), identische Ergebnisse.
Die dialysablen Fraktionen (DF) berechnen sich nach:

$$DF = \frac{\text{Menge des dialysablen Hormons}}{\text{Menge des Gesamthormons}}$$

$$DF = \frac{({}^{+}T_4)_o \ (V_i + V_o)}{({}^{+}T_4)_i (V_i) + ({}^{+}T_4)_o (V_o)} \qquad \text{(Gleichung 1)}$$

$(^{+}T_4)_o$ = Konzentration des Hormons im Aussenmedium (freies Hormon)

$(^{+}T_4)_i$ = Konzentration des Hormons im Säckchen (Gesamthormon)

V_i = Volumen des Dialysesäckchens

V_o = Volumen des Aussenmediums (Puffervolumen)

Oppenheimer und Surks (54) zeigten, dass die DF-Werte in einem weiten Verdünnungsbereich linear mit Zunahme der Gesamtverdünnung des Systems ansteigen, so dass der Quotient DF/D für ein gegebenes Serum konstant bleibt. (D = Verdünnungsfaktor des Serums im Gesamtsystem). Der Quotient DF/D gibt also die dialysierbare freie Fraktion des unverdünnten Serums an. Da die Verdünnung des Serums durch den Quotienten aus eingesetztem Serum und Gesamtvolumen des Systems gekennzeichnet ist, und da die Grösse des Nenners in Gleichung (1) fast ausschliesslich durch die Menge des Gesamthormons bestimmt wird, und so der zweite Teil des Nenners ($(^{+}T_4)_o$ (V_o) = Hormonmenge im Dialysat) unberücksichtigt bleiben kann, lässt sich Gleichung (1) wie folgt umformulieren:

$$DF/D = \frac{(^{+}T_4)_o\ (V_i + V_o) \times \text{Serumvolumen}}{(^{+}T_4)_i\ (V_i)\qquad\qquad (V_i + V_o)} \qquad \text{(Gleichung 2)}$$

Nach entsprechender Kürzung in Gleichung (2) ergibt sich demnach:

$$DF/D = \frac{(^{+}T_4)_o}{(^{+}T_4)_i} \times \frac{\text{Serumvolumen}}{V_i}$$

Nach dieser Formel werden die freien T_4-Fraktionen in unserem Verfahren berechnet: Wir vergleichen die Radioaktivitätsmengen in 3 ml gefälltem Dialysat mit den cpm aus 3 ml Säckcheninhalt. Diese werden aus den cpm des Vollwertes berechnet: 0,5 ml Puffer-Tracer-Gemisch liefern die cpm des Vollwertes; da er wie das verdünnte und markierte Serum zusammengesetzt ist, muss bei einer 1:6 Verdünnung zu den 0,5 ml des Puffer-Tracer-Gemisches der Serumanteil von 0,1 ml addiert werden; die Multiplikation der cpm des Vollwertes mit 5 liefern daher die cpm aus 3 ml Säckcheninhalt.
Der Quotient DF/D für 1:6 verdünntes Serum ergibt sich demnach aus:

$$FT_4\ (\%) = \frac{\text{cpm Dialysat} \times 100}{\text{cpm Vollwert} \times 30}$$

wobei die Leerwerte abgezogen werden. Üblicherweise wird dieser Ausdruck nicht als Fraktion,sondern in Prozent der Gesamthormonkonzentration angegeben.

Schliesslich war nachzuweisen, dass die Simultanbestimmung von prozentualem freien T_4 und T_3 aus einer Serumprobe mit den entsprechenden Einzelbestimmungen identische Werte ergibt. Aus Abb. 4 ist ersichtlich, dass das der Fall ist, so dass die zeitsparende Simultanbestimmung angewandt werden konnte.

Neben diesem ersten methodischen Schritt, der die Bedingungen der Dialyse darstellt, hängen die zu fordernden Qualitätskriterien in gleichem Masse vom zweiten Schritt des Verfahrens, von der möglichst quanti-

tativen, isolierten Präzipitation der dialysierten Hormone ab. Die Konstanz des pH-Wertes im Dialysat während der Dialyseperiode wurde nachgewiesen. Die Wichtigkeit, nur vorgereinigte Tracerchargen zu verwenden, um falsch hohe Werte durch Kopräzipitation von Verunreinigungen in Form von markierten Jodtyrosinen und anderen Jodthyroninen durch Magnesiumchlorid zu vermeiden, wurde bestätigt (Tab. 2) (21). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass das in den Tracern als wesentlichste Verunreinigung vorliegende oder entstehende radioaktive Jodid durch Magnesiumchlorid nicht mitgefällt wird (Tab. 9), so dass insgesamt unter Verwendung gereinigter Tracer-Chargen die Magnesiumchlorid-Präzipitation identische Werte mit der Trichloressigsäure-Fällung (Tab. 10) liefert. Wesentlich für Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode war schliesslich der Nachweis, dass einmalige Zugabe von $MgCl_2$ die Hormone nur unzureichend präzipitierte und dass mit einer nochmaligen Fällung des Präzipitatüberstandes die Werte für das freie T_4 um durchschnittlich 14 %, die des freien T_3 um 5 % anzuheben waren.

Bis vor kurzem stellte die hier untersuchte Methode der Gleichgewichtsdialyse mit anschliessender Magnesiumchlorid- oder Trichloressigsäure-Präzipitation des dialysierten Hormons das einzige Verfahren dar, mit dem in grösserem Umfang vor allem in wissenschaftlichen, aber auch in klinischen Fragestellungen Aufschlüsse über die freien Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum zu erhalten waren. In Tab. 12 sind unsere Ergebnisse denen anderer Autoren gegenübergestellt. Es ist zu ersehen,

dass das Prinzip der Gleichgewichtsdialyse mit anschliessender Tracerhormon-Präzipitation vergleichbare Werte ergibt.

Für den Einsatz in der klinischen Routinediagnostik ist die Methode zu arbeits- und zeitaufwendig. Gleiches gilt für eine Weiterentwicklung des Verfahrens, in der die Endpunktbestimmung der Hormonkonzentrationen radioimmunologisch aus dem Dialysat erfolgt (13). Erst eine vor kurzem entwickelte kinetische radioimmunologische Methode (36) scheint alle Anforderungen an ein Routineverfahren zu erfüllen, so dass in Zukunft auch die Konzentrationen der freien Schilddrüsenhormone, die weit besser als die der Gesamthormone mit dem tatsächlichen Stoffwechsel übereinstimmen, häufiger zur Diagnostik von Schilddrüsenerkrankungen herangezogen werden könnten.

3. Klinische Ergebnisse

Die mit der hier skizzierten Methode erzielten klinischen Ergebnisse sind in den folgenden Publikationen beschrieben:

1. Herrmann, J., H.J. Rusche, H.J. Kröll, P. Hilger und H.L. Krüskemper:
Free triiodothyronine (T_3)- and thyroxine (T_4) serum levels in old age.
Horm. Metab. Res. 6 (1974), 239 - 240.

2. Herrmann, J., H.J. Rusche, H.J. Kröll, K.H. Rudorff und H.L. Krüskemper:
Trijodthyronin: Abnahme der Serumkonzentration mit zunehmendem Alter.
Dtsch. med. Wschr. 99 (1974), 2122 - 2124.

3. Herrmann, J., H.J. Lehr, H.J. Kröll, H.J. Rusche, K.H. Rudorff und H.L. Krüskemper:
Excessive periphere Konversion von Thyroxin (T_4) zu Trijodthyronin (T_3) in der Pathogenese der T_3-Hyperthyreose.
Dtsch. med. Wschr. 100 (1975), 2319 - 2323.

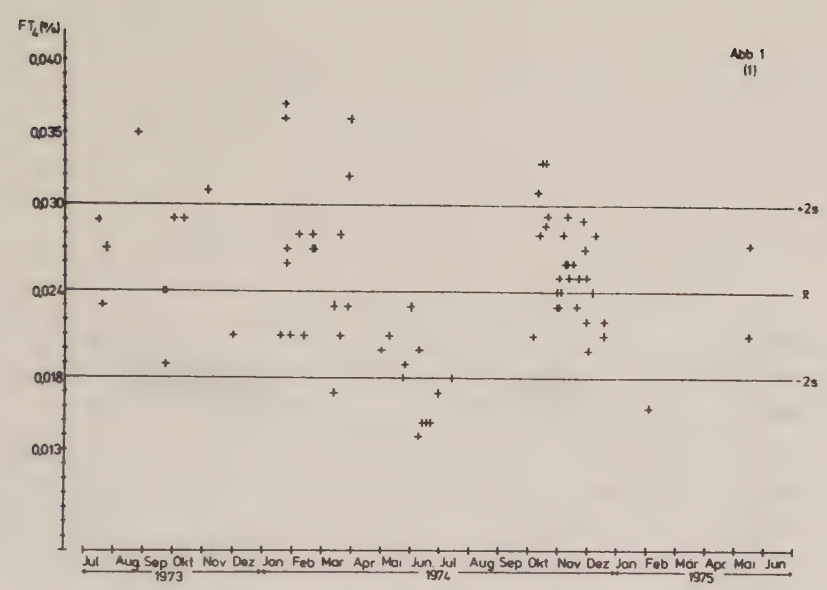
4. Legenden zu den Abbildungen

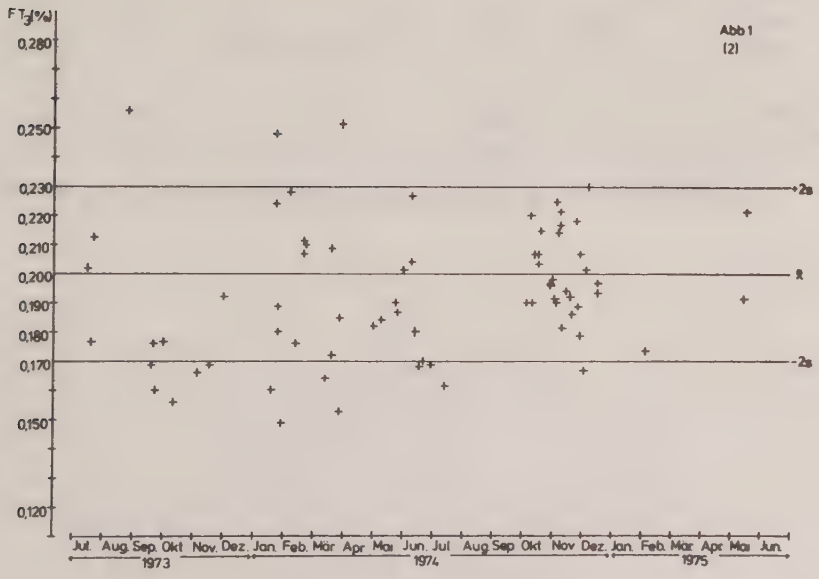
Abb. 1 Kontrollkarten; der 2s-Bereich kennzeichnet die Kontrollgrenzen;
(1) prozentuales freies T_4 eines Pool-Kontroll-Serums gegen die Zeit aufgetragen,
(2) prozentuales freies T_3 eines Pool-Kontroll-Serums gegen die Zeit aufgetragen.

Abb. 2 Prozentuales freies T_4/T_3 in Abhängigkeit von der Verdünnung des eingesetzten Serums und von der Reinheit des zugesetzten radioaktiven Hormons.

Abb. 3 Abhängigkeit der aus einem Pool-Serum simultan ermittelten prozentualen freien T_4/T_3-Werte (Ordinate) vom pH-Wert des Dialysates (Abszisse).

Abb. 4 Korrelation der Ergebnisse für das freie T_4/T_3 aus Simultanbestimmungen (Ordinate) mit denen aus Einzelmessungen (Abszisse).


FT4(%)
0,040
0,035
0,030
0,024
0,018
0,013
Abb 1
(1)
+2s
x̄
-2s
Jul Aug Sep Okt Nov Dez Jan Feb Mar Apr Mai Jun Jul Aug Sep Okt Nov Dez Jan Feb Mär Apr Mai Jun
1973
1974
1975


FT3(%)
0,280
0,250
0,230
0,220
0,210
0,200
0,190
0,180
0,170
0,150
0,120
Abb 1
(2)
+2s
x̄
-2s
Jul Aug Sep Okt Nov Dez Jan Feb Mär Apr Mai Jun Jul Aug Sep Okt Nov Dez Jan Feb Mär Apr Mai Jun
1973
1974
1975

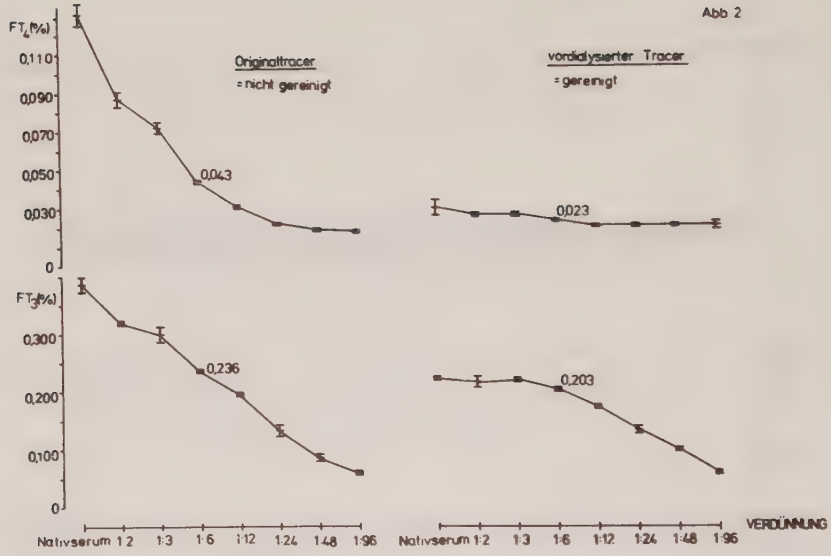


Abb 2
FT4(%)
0,110
0,090
0,070
0,050
0,030
0
Originaltracer
= nicht gereinigt
0,043
vordialysierter Tracer
= gereinigt
0,023
FT3(%)
0,300
0,200
0,100
0
0,236
0,203
Nativserum 1:2 1:3 1:6 1:12 1:24 1:48 1:96
Nativserum 1:2 1:3 1:6 1:12 1:24 1:48 1:96
VERDÜNNUNG

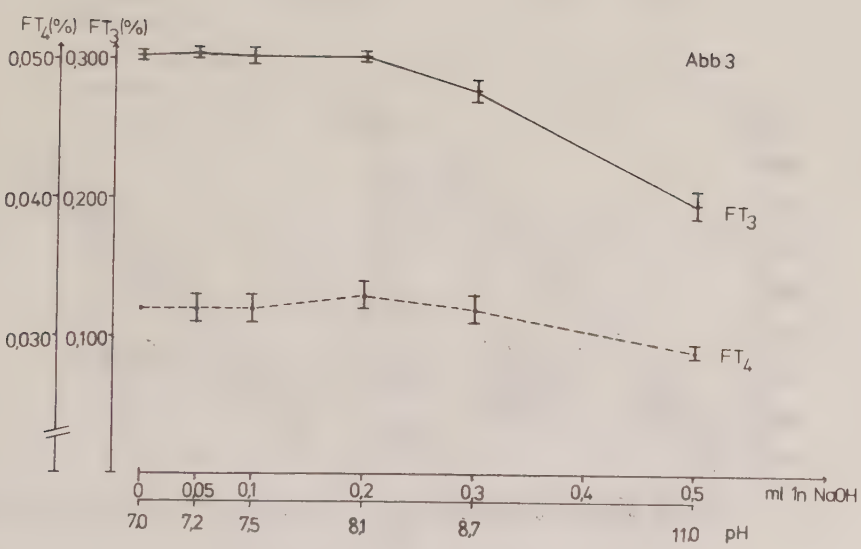
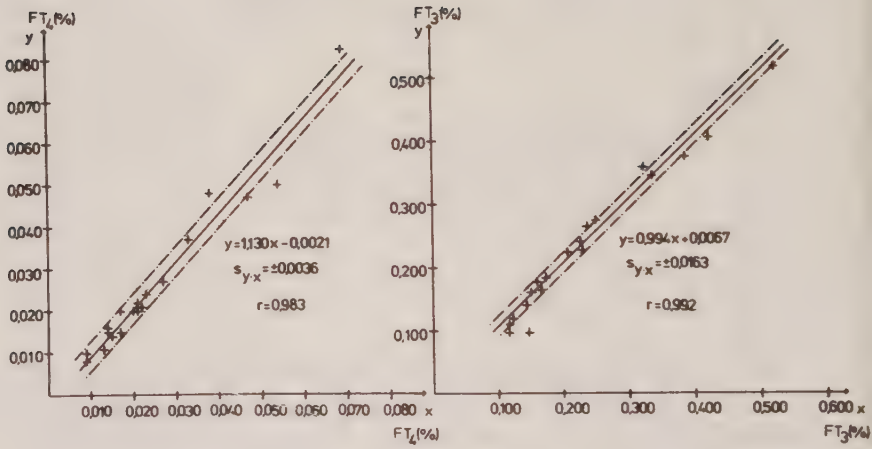

FT4(%)
FT3(%)
0,050
0,040
0,030
0,300
0,200
0,100
FT3
FT4
0
0,05
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
ml 1n NaOH
7,0
7,2
7,5
8,1
8,7
11,0
pH

Abb 3

Abb. 4


FT4(%)
y
0,080
0,070
0,060
0,050
0,040
0,030
0,020
0,010
y=1,130x - 0,0021
sy·x = ±0,0036
r=0,983
0,010 0,020 0,030 0,040 0,050 0,060 0,070 0,080 x
FT4(%)
FT3(%)
y
0,500
0,400
0,300
0,200
0,100
y=0,994x + 0,0067
sy·x = ±0,0163
r=0,992
0,100 0,200 0,300 0,400 0,500 0,600 x
FT3(%)

5. Literaturverzeichnis

1. Anderson, B.G.:
Free thyroxine in serum in relation to thyroid function.
J. Amer. Med. Ass. 203 (1968), 577.

2. Arango, G., W.E. Mayberry, T.J. Hockert, L.R. Elveback:
Total and free human serum thyroxine in normal and abnormal thyroid states.
Mayo Clin. Proc. 43 (1968), 503.

3. Beierwaltes, W.J., J. Robbins:
Familial increase in the thyroxine-binding sites in serum alpha globulin.
J. Clin. Invest. 38 (1959), 1683.

4. Bernstein, G., J.H. Oppenheimer:
Factors influencing the concentration of free and total thyroxine in patients with nonthyroidal disease.
J. Clin. Endocr. 26 (1966), 195.

5. Blumberg, B.S., L. Farer, J.E. Rall, J. Robbins:
Thyroxine-serum protein complexes: two dimension gel and paper electrophoresis studies.
Endocrinology 68 (1961), 25.

6. Braverman, L.E., A. Vagenakis, P. Downs, A.E. Foster, K. Sterling, S.H. Ingbar:
Effects of replacement doses of sodium-l-thyroxine on the peripheral metabolism of thyroxine and triiodothyronine in man.
J. Clin. Invest. 52 (1973), 1010.

7. Chin, W., G.C. Schussler:
Decreased serum free thyroxine concentration in patients treated with diphenylhydantoin.
J. Clin. Endocr. 28 (1968), 181.

8. Chopra, I.J., D.H. Solomon, G.N. Chua Teco:
Thyroxine: just a prohormone or a hormone too?
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36 (1973), 1050.

9. Chopra, I.J., D.H. Solomon, U. Chopra, R.T. Young, G.N. Chua Teco:
Alterations in circulating thyroid hormones and thyrotropin in hepatic cirrhosis: evidence for euthyroidism despite subnormal serum triiodothyronine.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39 (1974), 501.

10. Dowling, J.T., N. Freinkel, S.H. Ingbar:
Thyroxine-binding by sera of pregnant women, newborn infants, and women with spontaneous abortion.
J. Clin. Invest. 35 (1956), 1263.

11. Dowling, J.T., N. Freinkel, S.H. Ingbar:
Effect of diethylstilbestrol on the binding of thyroxine in serum.
J. Clin. Invest. 16 (1956), 1491.

12. Dussault, J.H., D.A. Fisher, J.T. Nicoloff, V.V. Row, R. Volpe:
The effect of alteration of thyroxine binding capacity on the dialyzable and absolute fractions of triiodothyronine in circulation.
Acta Endocrinologica 72 (1973), 265.

13. Ekins, P., S. Ellins:
The radioimmunoassay of free thyroid hormones in serum.
Excerpta Medica. Seventh International Thyroid Conference, Abstract no. 15,8, June 9 - 13, 1975.

14. Engbring, N.H., W.W. Engstrom:
Effects of estrogen and testosterone on circulating thyroid hormone.
J. Clin. Endocr. 19 (1959), 783.

15. Engler, D., E.B. Donaldson, J.R., Stockigt, P. Taft:
Hyperthyroidism without triiodothyronine excess: an effect of severe non-thyroidal illness.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46 (1978), 77.

16. Federman, D.D., J. Robbins, J.E. Rall:
Effects of methyl testosterone on thyroid function, thyroxine metabolism, and thyroxine-binding protein.
J. Clin. Invest. 37 (1958), 1024.

17. Flock, E.V., C. David, G.H.C. Stobie, C.A. Owen, Jr.:
3,3',5-Triiodothyronine and 3,3-diiodothyronine: partially deiodinated intermediates in the metabolism of the thyroid hormones.
Endocrinology 73 (1963), 442.

18. Florsheim, W.H., J.T. Dowling, L. Meister, R.E. Bodfish:
Familial elevation of serum thyroxine-binding capacity.
J. Clin. Endocr. 22 (1962), 735.

19. Haibach, H., J.M. McKenzie:
Increased free thyroxine postoperatively in the rat.
Endocrinology 81 (1967), 435.

20. Herrmann, J., H.L. Krüskemper:
Bestimmung des freien Thyroxins im Serum mit ^{125}J-markiertem Thyroxin.
Klinische Wochenschrift 46 (1968), 1285.

21. Herrmann, J., H.L. Krüskemper, H. Müller:
Zur Methodik der Bestimmung von freiem, dialysablem Thyroxin im Serum.
Clin. Chim. Acta 24 (1969), 457.

22. Herrmann, J., H.L. Krüskemper:
Freies Thyroxin im Serum (Äquilibriumdialyse mit nativem und verdünntem Serum).
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 9 (1971), 320.

23. Herrmann, J., H.K. Kley, H.L. Krüskemper, J. Köbberling, A. von zur Mühlen, D. Emrich:
Genetisch bedingte Konzentrationsänderungen des thyroxinbindenden Globulins und ihre Bedeutung für die Differentialdiagnose von Schilddrüsenfunktionsstörungen.
Der Internist 13 (1972), 37.

24. Herrmann, J., J. Bahlmann, H.L. Krüskemper:
Das Verhalten des Thyroxins sowie des thyroxinbindenden Globulins in Serum und Urin von Patienten mit renalen Thyroxinverlusten infolge nephrotischen Syndroms unterschiedlicher Genese.
Acta Endocrinologica 69 (1972), 13.

25. Herrmann, J., H.J. Rusche, H.L. Krüskemper:
Rapid radioimmunoassay for the evaluation of thyroxine in unextracted serum.
Clin. Chim. Acta 54 (1974), 69.

26. Hilger, P., J. Herrmann, H.L. Krüskemper:
Radioimmunologische Schnellmethode zur Messung von Trijodthyronin im Serum ohne Extraction.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 11 (1973), 323.

27. Hollander, C.S., V.V. Odak, T.E. Prout, S.P. Asper, jr.:
An evaluation of the role of prealbumin in the binding of thyroxine.
J. Clin. Endocr. 22 (1962), 617.

28. Hollander, C.S., R.L. Scott, D.P. Tschudy, M. Perlroth, A. Waxman, K. Sterling:
Increased protein-bound iodine and thyroxine-binding globulin in acute intermittent porphyria.
New England Journal of Medicine 227 (1967), 995.

29. Ingbar, S.H., N. Freinkel:
Regulation of the peripheral metabolism of the thyroid hormones.
Recent Progr. Hormone Res. 16 (1960), 353.

30. Ingbar, S.H.:
Clinical and physiological observations in a patient with an idiopathic decrease in the thyroxine-binding globulin of plasma.
J. Clin. Invest. 40 (1961), 2053.

31. Ingbar, S.H.:
Observations concerning the binding of thyroid hormones by human serum prealbumin.
J. Clin. Invest. 42 (1963), 143.

32. Ingbar, S.H., C. Waterhouse, P. Cushman:
Observations on the nature of underlying disorder and the occurence of associated plasma transport abnormalities in a patient with an idiopathic increase in the plasma thyroxine-binding globulin.
J. Clin. Invest. 43 (1964), 2266.

33. Ingbar, S.H., L.E. Braverman, N.A. Dawber, G.Y. Lee:
A new method for measuring the free thyroid hormone in human serum and an analysis of the factors that influence its concentration.
J. Clin. Invest. 44 (1965), 1679.

34. Irvine, C.H.G.:
Measurement of the free thyroxine in human serum by a sephadex binding method.
J. Clin. Endocrinol.Metab. 38 (1974), 655.

35. Kendall, E.C., A.E. Osterberg:
The chemical identification of thyroxine.
J. Biol. Chem. 40 (1919), 265.

36. Kommerzieller Test-Kid der Firma Corning.

37. Lardy, H.:
Effect of thyroid hormones on enzyme systems.
In: The Thyroid. Brookhaven. Symposium in Biology 1955 no. 7 p. 94.

38. Larsen, P.:
Salicylate-induced increases in free triiodothyronine in human serum.
Evidence of inhibition of triiodothyronine binding to thyroxine-binding globulin and thyroxine-binding prealbumin.
J. Clin. Invest. 51 (1972), 1125.

39. Lee, N.D., R.J. Henry, O.J. Golub:
Determination of free thyroxine content of serum.
J. Clin. Endocr. 24 (1964), 486.

40. Michajlovskij, ., P. Langer:
Increase of serum free thyroxine following the administration of thiocyanate and other anions in vivo and in vitro.
Acta Endocrinologica 75 (1974), 707.

41. Nauman, J.A., A. Nauman, S.C. Werner:
Total and free triiodothyronine in human serum.
J. Clin. Invest. 46 (1967), 1346.

42. Nicoloff, J.T., J.T. Dowling, D.D. Patton:
Inheritance of decreased thyroxine-binding by the thyroxine-binding globulin.
J. Clin. Endocr. 24 (1964), 294.

43. Oppenheimer, J.H., L.V. Fisher, K.M. Nelson, J.W. Jailer:
Depression of the serum protein-bound iodine level by diphenylhydantoin.
J. Clin. Endocr. 21 (1961), 252.

44. Oppenheimer, J.H., R. Squef, M.I. Surks, H. Hauer:
Binding of thyroxine by serum proteins evaluated by equilibrium dialysis and electrophoretic techniques. Alterations in non-thyroidal illness.
J. Clin. Invest. 42 (1963), 1769.

45. Oppenheimer, J.H., M.I. Surks:
Determination of free thyroxine in human serum: a theoretical and experimental analysis.
J. Clin. Endocr. 24 (1964), 785.

46. Oppenheimer, J.H., S.C. Werner:
Effect of prednisone on thyroxine-binding proteins.
J. Clin. Endocr. 26 (1966), 715.

47. Recant, L., D.S. Riggs:
Thyroid function in nephrosis.
J. Clin. Invest. 31 (1952), 789.

48. Robbins, J., J.H. Nelson:
Thyroxine-binding by serum protein in pregnancy and in the newborn.
J. Clin. Invest. 37 (1958), 153.

49. Robbins, J., J.E. Rall:
Proteins associated with the thyroid hormones.
Physiol. Rev. 40 (1960), 415.

50. Rosenberg, I.N., C.S. Ahn, M.L. Mitchell:
Effects of anabolic steroids upon circulating thyroid hormons.
J. Clin. Endocr. 22 (1962), 612.

51. Schatz, D.L., R.H. Sheppard, G. Steiner, C.S. Chandarlapaty, G.A. de Veber:
Influence of heparin on serum free thyroxine.
J. Clin. Endocr. 29 (1969), 1015.

52. Schussler, G.C., J.E. Plager:
Free thyroxine in human serum.
Clin. Res. 23 (1965), 248.

53. Schussler, G.C., J.E. Plager:
Effect of preliminary purification of ^{131}I-thyroxine on the determination of free thyroxine in serum.
J. Clin. Endocr. 27 (1967), 242.

54. Spaulding, S.W., R.I. Gregerman:
Free thyroxine in serum by equilibrium dialysis: effects of dilution, specific ions and inhibitors of binding.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 34 (1972), 974.

55. Sterling, K., R.B. Chodos:
Radiothyroxine turnover studies in myxedema, thyrotoxicosis, and hypermetabolism without endocrine disease.
J. Clin. Invest. 35 (1956), 806.

56. Sterling, K., P. Rosen, M. Tabachnick:
Equilibrium dialysis studies of the binding of thyroxine by human serum albumin.
J. Clin. Invest. 41 (1962), 1021.

57. Sterling, K., A. Hegedus:
Measurement of free thyroxine concentration in human serum.
J. Clin. Invest. 41 (1962), 1031.

58. Sterling, K.:
Molecular structure of thyroxine in relation to its binding by human serum albumin.
J. Clin. Invest. 43 (1964), 1721.

59. Sterling, K., M.A. Brenner:
Free thyroxine in human serum: simplified measurement with the aid of magnesium precipitation.
J. Clin. Invest. 45 (1966), 153.

60. Surks, M.I., J.H. Oppenheimer:
Effect of penicillin on thyroxine-binding by plasma proteins.
Endocrinology 72 (1963), 567.

61. Surks, M.I., J.H. Oppenheimer:
Postoperative changes in the concentration of thyroxine-binding prealbumin and serum free thyroxine.
J. Clin. Endocr. 24 (1964), 794.

62. Tabachnick, M.:
Thyroxine-protein interactions. I. Binding of thyroxine to human serum albumin and modified albumins.
J. Biol. Chem. 239 (1964), 1242.

63. Tanaka, S., P. Starr:
A euthyroid man without thyroxine-binding globulin.
J. Clin. Endocr. 19 (1959), 485.

64. Volpert, E.M., M. Martinez, J.H. Oppenheimer:
Radioiodinated impurities in commercial preparations of ^{131}J-thyroxine and their effect on the measurement of free thyroxine in human serum by equilibrium dialysis.
J. Clin. Endocr. 27 (1967), 421.

65. Woeber, K.A., S.H. Ingbar:
The effects of noncalorigenic congeners of salicylate on the peripheral metabolism of thyroxine.
J. Clin. Invest. 43 (1964), 931.

66. Walfish, P.G., A. Britton, R. Volpé, C. Ezrin:
Quantitative plasma binding capacity studies of thyroxine-binding globulin by use of a modification of the erythrocyte 1-triiodothyronine-^{131}I uptake test.
J. Clin. Endocr. 22 (1962), 178.

67. Wolff, J., M.E. Standaert, J.E. Rall:
Thyroxine displacement from serum proteins and depression of serum protein-bound iodine by certain drugs.
J. Clin. Invest. 40 (1961), 1373.

Herrn Prof. Dr. Krüskemper danke ich für die Möglichkeit, die Untersuchungen in der von ihm geleiteten Klinik durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Herrmann gilt mein besonderer Dank für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

6. Lebenslauf

Hermann-Josef K r ö l l

Geboren 9. Februar 1951 in Neuss

Eltern Wilhelm Kröll,
Christine Kröll, geb. Titgens

Schulausbildung

1957 - 1961 Volksschule in Neuss

1961 - 1969 Besuch des Theodor Schwann Gymnasiums in Neuss mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig, dort Abitur 1969

Studium

1969 - 1976 Studium der Humanmedizin in Düsseldorf

1970 Vorphysikum

1972 Physikum

1976 Staatsexamen

Medizinalassistentenzeit

1.10.1976 - 31.10.1977 Lukaskrankenhaus in Neuss (Innere Medizin, Chirurgie, Anaesthesie)

Approbation als Arzt

1.11.1977

Wehrdienst bei der Bundeswehr

1.11.1977 - 31.1.1979 als Truppenarzt

Seit dem 15.3.1979 wissenschaftlicher Angestellter in der Medizinischen Klinik C der Universität Düsseldorf

Druck: Hundt Druck GmbH, Zülpicher Str. 220, 5000 Köln 41, Tel. (0221) 44 41 52